

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi UGM, Laboratorium Penelitian FKIK UMY, dan Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2014 – Maret 2015. Rancangan jadwal kegiatan dapat dilihat pada Lampiran 1.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a) Uji Aktivitas Antibakteri

Variabel Bebas : Konsentrasi ekstrak etanolik bawang putih
(*Allium sativum* L.) pada variasi fraksi pelarut

Variabel Tergantung : Nilai DZI masing-masing fraksi pelarut dari
ekstrak etanolik bawang putih (*Allium sativum* L)

Variabel Terkendali : Media pertumbuhan bakteri

b) Uji *Molecular Docking* dengan AutoDockTools

Variabel Bebas : Bentuk konformasi ikatan antara ligan dan protein target

Variabel Tergantung : *Docking Score*

Variabel Terkendali : *Hardware, software*, struktur ligan, dan protein target

2. Definisi Operasional

- a) KHM adalah konsentrasi minimal masing-masing fraksi ekstrak bawang putih (*Allium sativum* L.) yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* yang ditunjukkan melalui pengukuran DZI.
- b) DZI adalah diameter yang menunjukkan hambatan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri yang diuji dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).
- c) *Docking score* merupakan nilai yang menggambarkan energi ikatan atau *binding energy* antara ligan dan protein target. Semakin kecil energi ikatan suatu konformasi, maka hasil *docking* semakin baik.

D. Instrumen Penelitian

Tabel 1 merupakan daftar alat-alat yang digunakan dalam penelitian, sedangkan bahan penelitian disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 1. Alat Penelitian

No	Nama Alat	Sumber/Merek dan Tipe
1	Bejana	Stainless steel
2	Pisau	HB Stainless®
3	Blender	
4	<i>Rotary Evaporator</i>	Heidolph®
5	Penangas	Akebonno®
6	Penggaris	<i>Brand</i> ®
7	Oven	Shimadzu®
8	Inkubator	Memmert®
9	Autoklaf	All American®
10	Propipet	Glasfirn®
11	Mikropipet	Gilson®
12	Timbangan analitik	Casbee®
13	Alat-alat gelas	Pyrex®
14	Kertas label	<i>Brand</i> ®
15	Kain hitam	
16	<i>Centrifuge</i>	Digisystem Laboratory Instruments®
17	GC-MS	Shimadzu®
18	<i>Laminar Air Flow (LAF)</i>	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
19	Kapas lidi	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
20	Ose steril	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
21	<i>Paper disc</i>	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
22	Pinset	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
23	Seperangkat Komputer	Acer®

Tabel 2. Bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Sumber/Merek dan Tipe
1	Bawang putih	Bandung, Tulungagung
2	Siprofloksasin Infus	Novell Pharmaceutical Laboratories®
3	Etanol 70%	Mandiri Surya® /Grade Teknis
4	Metanol	Universitas Gadjah Mada
5	Etilasetat	Universitas Gadjah Mada
6	n-heksan	Universitas Gadjah Mada
7	Koloni <i>Shigella flexneri</i>	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
8	NaCl fisiologis	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
9	BHI	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
10	Mac Conkey	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
11	Aquadest	Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
12	Protein Target	RCSB
13	Struktur Ligan	PubChem

E. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi bawang putih dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

2. Penyiapan Bahan

Bawang putih (*Allium sativum* L.) sebanyak 32 kg dibersihkan dari kulit ari dan pengotornya, selanjutnya dicuci dalam air mengalir hingga bersih, ditiriskan, lalu dirajang sedemikian rupa sehingga tampak tipis dan

dikeringkan dengan dijemur dibawah sinar matahari yang diberi tutup kain hitam pada bagian permukaan hingga simplisia kering. Simplisia kering diperoleh sebanyak 10 kg kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender hingga halus.

3. Pembuatan Ekstrak Etanolik Bawang Putih

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk halus sebanyak 10 kg selanjutnya direndam dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 50 liter dalam bejana yang tertutup rapat (1 : 5 b/v). Proses maserasi dilakukan selama 24 jam disertai pengadukan secara periodik untuk memberi kesempatan zat aktif untuk berdifusi ke dalam pelarut. Selanjutnya sari diserkai, dan ampas diperas menggunakan kain flanel. Filtrat tersebut selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga terbentuk ekstrak kental.

4. Fraksinasi Ekstrak

Setelah diperoleh ekstrak kental etanolik bawang putih (*Allium sativum* L.), selanjutnya dilakukan fraksinasi ekstrak menggunakan pelarut metanol, etilasetat, dan n-heksan dengan menggunakan prosedur ekstraksi cair-cair. Ekstrak kental etanol terlebih dahulu dibagi menjadi 3 bagian dalam erlenmeyer dengan masing-masing bagian sebanyak 600 gram. Masing-masing bagian kemudian diencerkan dengan menggunakan air panas sebanyak 200 ml dan diaduk hingga encer dan homogen. Masing-masing bagian ekstrak kental etanolik yang telah diencerkan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 2000 ml dan ditambahkan

masing-masing pelarut dengan jumlah tertentu sehingga diperoleh perbandingan ekstrak kental etanolik bawang putih dan masing-masing pelarut sebesar 1:1 *b/v*.

Ekstraksi cair-cair dilakukan di dalam corong pisah. Erlenmeyer yang telah berisi ekstrak kental etanolik bawang putih dan suatu pelarut, kemudian dimasukkan dalam corong pisah dan dilakukan pengocokan. Campuran tersebut selanjutnya didiamkan dan dilakukan pemisahan antara lapisan atas (fraksi pelarut) dan lapisan bawah (residu). Ekstraksi cair-cair dilakukan sebanyak 2 kali ulangan dengan menggunakan 300 ml pelarut untuk sekali pemisahan. Sari pertama dan kedua dikumpulkan dan dipekatkan dengan penguap *rotary evaporator*. Proses yang sama juga dilakukan pada pelarut yang lain sehingga didapatkan ekstrak kental untuk masing-masing pelarut (metanol, etilasetat, dan n-heksan).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan menggunakan oven dengan suhu 170°C selama 2 jam. Ose dan pinset disterilkan dengan menggunakan bunsen. Bahan-bahan seperti media Mac Conkey disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan aquadest disterilkan dengan penangas hingga mendidih selama 15 menit. Sampel yang telah dibuat variasi konsentrasi, semua alat, dan bahan kecuali suspensi

bakteri sebelum dilakukan pengujian dilakukan sterilisasi menggunakan lampu UV selama 30 menit.

b. Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin. Siprofloksasin yang digunakan untuk pengujian sebanyak 5 μ g sehingga diperlukan konsentrasi 5 μ g/10 μ l untuk 1 *paper disc*. Untuk menghasilkan larutan uji tersebut, maka sebanyak 1 ml sediaan infus siprofloksasin 2 mg/ml dimasukkan ke dalam gelas ukur kemudian ditambahkan aquadest hingga volume 4 ml.

c. Pembuatan Kontrol Negatif

Ada 2 kontrol negatif yang digunakan, yaitu aquadest dan campuran aquadest dan span 80. Campuran aquadest dan span 80 dibuat dengan menambahkan 0,5 ml span 80 dengan aquadest hingga volume 10 ml.

d. Pembuatan Larutan Uji

Masing-masing fraksi ekstrak kental bawang putih dibuat larutan induk dengan konsentrasi 100% dengan cara melarutkan 2 g masing-masing fraksi ekstrak dengan aquadest hingga volume 2 ml. Khusus untuk fraksi ekstrak etilasetat dan n-heksan sebelum dilarutkan dengan aquadest maka ditambahkan 0,1 ml span 80. Larutan uji dibuat variasi konsentrasi 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, dan 75% v/v dengan cara melarutkan 0,01 ml, 0,05 ml, 0,1 ml, 0,25 ml, 0,5 ml, dan 0,75 ml

masing-masing fraksi larutan induk dengan aquadest hingga volume 1 ml.

e. Pembuatan Media Agar

Media agar yang digunakan berasal dari Mac Conkey. Sebanyak 20 g serbuk agar Mac Conkey dilarutkan dalam 385 ml aquadest. Selanjutnya dimasukkan ke dalam alat gelas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Kemudian media Mac Conkey tersebut dituangkan pada 16 cawan petri dalam kondisi aseptik dalam *Laminar Air Flow* dan ditunggu hingga mengeras.

f. Preparasi Bakteri

Sebanyak 4 koloni bakteri *Shigella flexneri* diambil dan dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis. Selanjutnya inkubasi selama 2 hingga 4 jam pada suhu 37° C. Setelah itu larutan suspensi bakteri tersebut diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan dengan menggunakan nutrien BHI dengan perbandingan 1 : 9 sambil dihomogenkan.

g. Uji Daya Antibakteri

Suspensi bakteri yang terbentuk kemudian diusap secara merata pada cawan petri yang telah berisi media padat Mac Conkey dengan menggunakan kapas lidi steril.

Selanjutnya *paper disk* direndam dengan larutan uji sesuai dengan masing-masing perlakuan. Khusus kontrol positif diambil sebanyak 10µl dari larutan siprofloksasin yang telah diencerkan dan diteteskan pada

paper disc. *Paper disc* yang telah berisi masing-masing ekstrak terfraksi dengan variasi konsentrasi, kontrol positif, dan kontrol negatif kemudian ditempelkan pada permukaan media agar. Perlakuan ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Selanjutnya diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Hasilnya dapat dilihat dengan terbentuknya diameter hambatan secara radial (DZI) disekitar *paper disc* dan diukur menggunakan penggaris/ jangka sorong. Cara pengukuran DZI dapat dilihat pada Lampiran 3. Diameter hambatan dari masing-masing ekstrak terfraksi dengan variasi konsentrasi tersebut selanjutnya dibandingkan dengan diameter hambatan yang terbentuk pada kontrol positif dan kontrol negatif.

6. Analisis Kandungan Kimia Metode GC-MS

Analisis ini dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa-senyawa organosulfur dalam fraksi ekstrak bawang putih (*Allium sativum* L.) yang telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. Instrumen ini berupa GC dengan detektor MS. Pemisahan senyawa dengan GC menggunakan kolom AGILENTJ%W DB-1 dengan panjang 30 meter serta memiliki ketebalan internal 0,25 mm. Fase gerak (*carrier gas*) digunakan gas helium dengan kecepatan 0,54 ml/menit. Sistem pemanasan diatur dari suhu 50 hingga 260°C dengan peningkatan sebesar 5°C setiap menit. Dalam instrumen MS digunakan energi ionisasi sebesar 70 eV dengan metode *electron impact* (EI).

Analisis ini hanya dilakukan pada fraksi ekstrak yang terbukti memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan. Sampel uji mula-mula dilarutkan dengan pelarut yang sesuai (metanol/etilasetat/n-heksan) secukupnya hingga diperoleh konsentrasi 1%. Selanjutnya 1 μ l sampel tersebut diinjeksikan ke dalam instrumen GC. Hasilnya akan diamati melalui spektrum yang diinterpretasikan berdasarkan berat molekul dan waktu retensi (Rt) senyawa organosulfur yang dituju.

7. Uji *Molecular Docking* dengan AutoDockTools

a. Preparasi Protein Target

Protein target yang digunakan dalam uji *in silico* adalah DNA gyrase subunit B dengan nama *crystal structure of a topoisomerase ATPase inhibitor*. Data protein diperoleh dari RCSB (<http://www.rcsb.org>) dengan PDB ID 3TTZ. *File* protein target tersebut diunduh dengan format PDB *file (gz)*. Selanjutnya *file* tersebut dibuka dengan aplikasi *Discovery Studio Visualizer* dan dilakukan preparasi dengan menghilangkan komponen pengganggu seperti residu sehingga tersisa 1 protein target. Hasil tersebut kemudian disimpan dalam format PDB *file (*.pdb)*.

b. Preparasi Ligan

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa-senyawa organosulfur yang diperoleh melalui analisis GC-MS dari fraksi ekstrak yang terbukti signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. Data ligan diunduh melalui *major ligand database*

seperti PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan dipilih dalam bentuk 3D SDF. *File* ligan tersebut dibuka melalui aplikasi *Discovery Studio Visualizer* dan disimpan dalam format PDB (*.pdb).

c. **Preparasi Ligan dan Protein Target Dalam Format PDBQT**

Langkah ini berfungsi untuk mempersiapkan kebutuhan *docking* yang meliputi ligan dan protein target dalam format PDBQT. Hasil preparasi protein dilakukan preparasi lebih lanjut dengan aplikasi AutoDockTools dengan menambahkan atom hidrogen polar yang berfungsi untuk memberikan muatan parsial (*partial charges*) dalam protein target tersebut. Selain itu target protein perlu ditambahkan muatan melalui pilihan *Kollman Charges* dan disimpan dalam format *.pdbqt.

Setelah dilakukan preparasi protein target selanjutnya dilakukan *input* ligan melalui perintah *Open Ligand* pada aplikasi AutoDockTools. Ligan yang telah masuk ke dalam protein target kemudian dilakukan preparasi dalam hal *Torsion Free* dan *Aromatic Carbons* dan disimpan dalam format *.pdbqt.

d. **Preparasi Grid Parameter File**

Proses ini merupakan proses lanjutan dari langkah sebelumnya. Aplikasi AutoDockTools yang masih terbuka kemudian dipilih bagian *Grid* dan dipilih ligan melalui fungsi *Set Map Types* dan dilanjutkan penyiapan *Grid Box*. *Grid Box* merupakan penentuan area untuk

simulasi *docking*. Kemudian hasil *grid* disimpan dalam format *grid parameter file* (*.gpf).

e. Preparasi *Docking Parameter File*

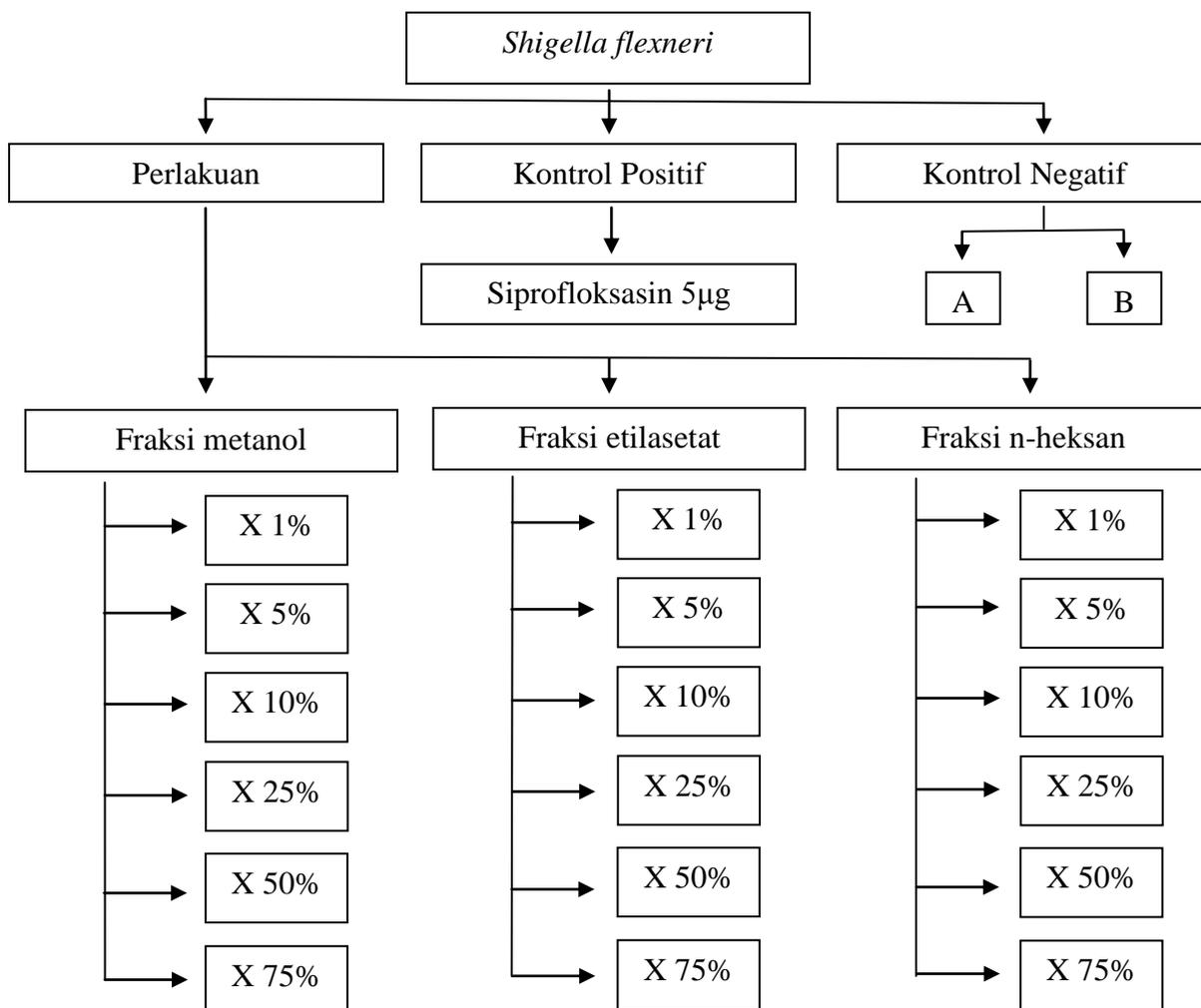
Proses ini diawali dengan memilih protein target dan ligan melalui pilhan *docking* pada aplikasi AutoDockTools. Proses *docking* dapat dilakukan pengaturan melalui perintah *Search Parameters* dan *Docking Parameters*. Selanjutnya pada bagian *output* dipilih *Lamarckian Genetic Algorithm* dan disimpan dalam format *docking parameter file* (*.dpf).

f. Simulasi *Docking*

Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan AutoGrid 4.2 dan AutoDock 4.2 melalui Cygwin Terminal. *File* hasil preparasi sebelumnya yang meliputi *Target.pdbqt*, *Ligand.pdbqt*, *grid parameter file* (*.gpf), dan *docking parameter file* (*.dpf) disimpan dalam 1 folder pada Cygwin Terminal. Hasil simulasi *docking* ini berupa *file* dengan format *.dlg yang berisi informasi 10 konformasi dan *file* complex.pdb untuk kebutuhan visualisasi hasil.

F. Skema Langkah Kerja

a. Uji Aktivitas Antibakteri



Keterangan :

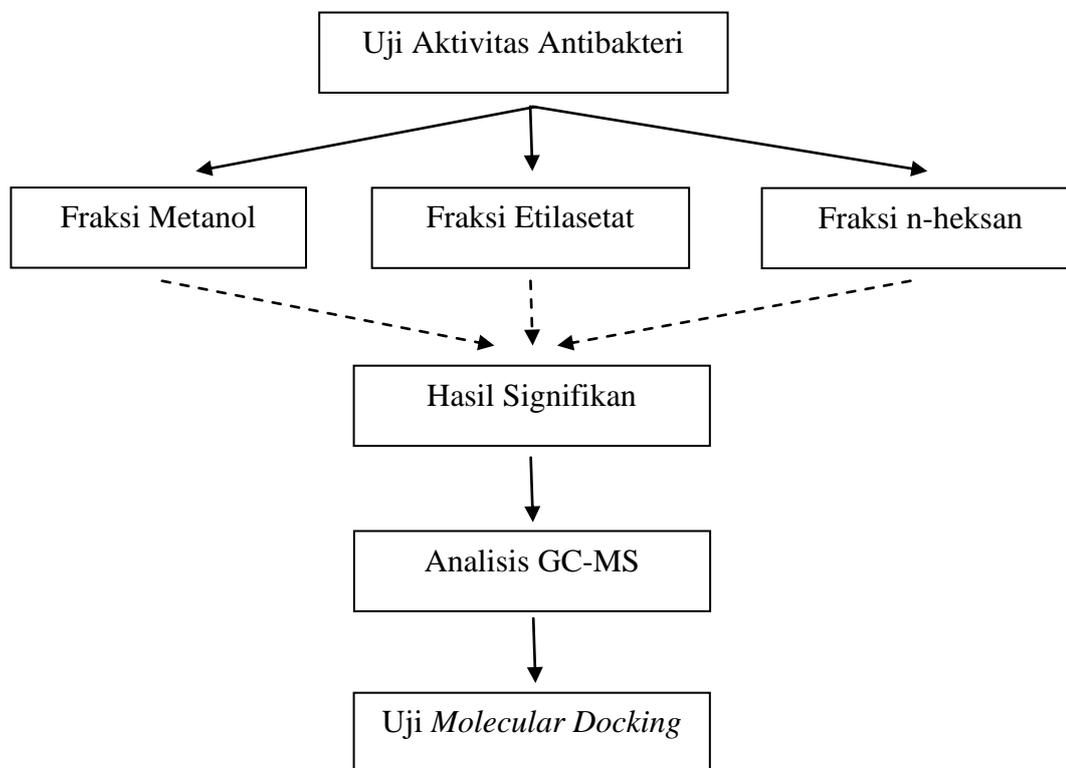
A : Aquadest steril

B : Campuran aquadest steril dan span 80

X : Konsentrasi perlakuan pada masing-masing fraksi pelarut

Gambar 6. Skema Langkah Kerja Uji Antibakteri

b. Analisis GC-MS dan Uji *In Silico*



Gambar 7. Skema Langkah Kerja Secara Umum

G. Analisis Data

1. Analisis Uji Aktivitas Antibakteri

Data yang diperoleh pada pengujian ini adalah nilai DZI pada masing-masing perlakuan. Perbedaan data penelitian antara masing-masing konsentrasi setiap fraksi pelarut dilakukan analisis parametrik dengan uji ANOVA menggunakan program SPSS.

2. Analisis Kandungan Kimia Metode GC-MS

Analisis kandungan senyawa golongan organosulfur dari fraksi ekstrak bawang putih yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri

yang signifikan terhadap bakteri *Shigella flexneri* dilakukan dengan cara melihat spektrum hasil pemisahan instrumen GC yang berupa *peak* berdasarkan nilai waktu retensi (Rt). Selanjutnya dalam output MS, *peak* masing-masing nilai waktu retensi (Rt) yang muncul diinterpretasikan berdasarkan nilai m/z senyawa-senyawa organosulfur yang dituju seperti dialil disulfida, dialil trisulfida, dialil tetrasulfida, 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin, dll.

3. Uji *Molecular Docking* dengan AutoDockTools

Hasil uji *molecular docking* menggunakan AutoDockTools 4.2 diperoleh *data file* dengan format *.dlg dan *file complex.pdb*. *File* dengan format *.dlg dibuka melalui aplikasi AutoDockTools dan berisi 10 konformasi ikatan antara ligan dan protein target. Dari hasil tersebut kemudian dipilih 1 konformasi yang memiliki energi ikatan yang paling rendah untuk kemudian dianalisa interaksinya.

Analisis untuk mengetahui interaksi antara ligan dan protein target dapat diketahui setelah divisualisasi. Visualisasi hasil simulasi *docking* dilakukan dengan membuka *file complex.pdb* menggunakan aplikasi *Discovery Studio Visualizer*. Dari 10 konformasi yang terbentuk pada kompleks ikatan ligan dan protein, selanjutnya semua kompleks dihapus kecuali kompleks yang diketahui memiliki hasil yang terbaik. Selanjutnya protein target dilakukan *labeling* berdasarkan asam amino, sedangkan ligan dilakukan *labeling* berdasarkan atom. Hasil akhir dari proses visualisasi ini diketahui setelah dipilih fungsi *Ligand Interactions*

sehingga akan terlihat ikatan antara asam amino dari protein target yang mengikat pada suatu atom dari struktur ligan.

Uji *molecular docking* ini dilakukan pada senyawa-senyawa organosulfur pada fraksi yang terbukti signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. Analisis dilakukan dengan membandingkan energi ikatan (*binding energy*) dari konformasi terbaik masing-masing senyawa organosulfur dengan siprofloksasin dan *ref ligand*/ ligan referensi.